

# **IMMUNHISTOKJEMISKE ANALYSER AV KREFTRELATERTE PROTEINER I ARKIVMATERIALE FRA 400 TYKKTARMSVULSTER, PREKLASSIFISERT KLINISK OG GENETISK**

**Pilotstudie:** Bcl-2 proteinet og enzymet Caspase3 hos 54 pas. operert for colorectal cancer ved AHUS fra 1987 til 1989.

## Abstract

**BACKGROUND:** An imbalance between apoptotic and proliferative process is believed to underlie colorectal neoplasia. Protein Bcl-2 and the enzyme caspase3 are involved in the apoptotic process in the cell.

**AIM:** To determine the prevalence of Bcl-2 protein and caspase3 enzyme immunohistochemical expression and their correlation with clinico-pathological parameters.

**METHODS:** Fifty-four paraffin embedded specimens collected from patients operated on at Akershus University Hospital in 1987-1989 for colorectal carcinomas were immunohistochemically performed to detect the expression of Bcl-2 and caspase3 activity. The results were obtained by semi-quantitatively evaluate the degree of expression of the protein Bcl-2 and enzyme caspase3, and compared the results with clinic-pathological characteristics of the patients. We assessed the statistical significance by the chi-square test.

**RESULTS:** Most Bcl-2 positive cases had Dukes stage B or C ( $P=0,048$ ). Expression of Bcl-2 protein was unrelated to patient age, sex, tumor site, cellular atypia or P53. There was a trend towards increased survival as measured by less relapses in those whose tumors expressed Bcl-2 positive protein ( $P=0,063$ ). No correlation among Bcl-2 and caspase3 expression was observed.

Caspase3 positive tumor tissue tended to be moderately differentiated ( $P=0,07$ ). Caspase3 was unrelated to prognosis, patient age, tumor site, cellular atypia or P53.

A trend towards positive correlation between intensity of expression of Bcl-2 and distribution of expression of Bcl-2 in the tissue was obtained ( $P=0,08$ ) and caspase3 showed the same tendency ( $P=0,08$ ).

**CONCLUSION:** Analysis of Bcl-2 expression in tumor tissue may have a role in predicting prognosis because of a trend toward increased survival as measured by less relapses.

However, the potential use of Bcl-2 and caspase3 assessment in the clinical use remains to be determined. The number of patients in our study was small, and we believe that investigation of a larger series of patients is indicated.

## Sammendrag

**BAKGRUNN:** En ubalanse mellom apoptose og proliferasjon er en underliggende årsak til colorectal neoplasia. Proteinet Bcl-2 og enzymet caspase3 er involvert i den apoptotiske prosessen i cellen.

**FORMÅL:** Å analysere forekomsten av Bcl-2 proteinet og caspase3 enzymet immunhistokjemisk og sammenhengen av disse med kliniske variabler.

**METODE:** 54 parafin fiksererte vevsblokker fra pasienter operert ved Akershus Universitetssykehus for colorectal kreft i tiden 1987-1989 ble farget med immunhistokjemisk metode for å gjenkjenne Bcl-2 ekspresjon og caspase3 aktivitet. Resultatene ble registrert ved semi-kvantitativ evaluering av ekspresjonsgraden av proteinet Bcl-2 og enzymet caspase3, og sammenliknet med de klinisk-patologiske karakteristika til pasientene. Statistisk signifikans ble beregnet ved å utføre kji-kvadrat test.

**RESULTAT:** De fleste Bcl-2 positive svulster hadde Dukes' stadiet B eller C ( $P=0,048$ ). Vi har ikke funnet sammenheng mellom ekspresjon av Bcl-2 og pasientens alder, kjønn, tumorlokalisasjon, cellulær atypi eller P53. Våre resultater viser tendens til bedre overlevelse hos pasienter med Bcl-2 positive svulster ettersom de sjeldnere får tilbakefall ( $P\text{-verdi} = 0,063$ ).

Ingen sammenheng mellom Bcl-2 og caspase3 ekspresjon ble observert.

De fleste caspase3 positive svulster var middel differensiert. Caspase3 viste ingen sammenheng med prognose, pasientens alder, tumorlokalisasjon, cellulær atypi eller P53.

Det var en positiv sammenheng mellom grad av intensitet av Bcl-2 uttrykt i vevet og distribusjon av Bcl-2 i timorvevet ( $P=0,08$ ), caspase3 viste samme tendens ( $P\text{-verdi}=0,08$ ).

**KONKLUSJON:** Analyse av Bcl-2 i tumorvev kan ha sammenheng med prognose da våre data fremsatt viste mindre tilbakefall. Bruken av Bcl-2 og caspase3 til klinisk sammenheng er uklar. Antallet pasienter i studiet vårt var lite, og vi mener at det bør inkluderes et større pasientmateriale i studiet.

# Innhold

Abstract .....	2
Sammendrag.....	3
Innhold .....	4
Figurer .....	6
Tabeller.....	6
1    Innledning.....	7
1.1    Bakgrunn .....	7
2    Kolorectal cancer.....	8
2.1    Epidemiologi .....	8
2.2    Prognose .....	8
2.3    Risikofaktorer .....	8
2.4    Kostfaktorer .....	9
2.5    Medikamenter .....	9
2.6    Inflammatorisk tarmsykdom.....	9
2.7    Arvelige syndromer .....	9
2.8    Arvelig colon-endometriekreft .....	10
2.9    Symptomer.....	10
2.10    Diagnostikk .....	11
2.11    Molekylær genetikk ved kolorektal kreft.....	12
3    Programmert Celledød; Apoptose .....	15
3.1    P53 .....	15
3.2    Bcl-2 .....	15
3.3    Caspaser.....	15
4    Materiale og metode.....	17
4.1    Pasienter.....	17
4.2    Immunhistokjemi.....	17
4.3    Antistoffer.....	18

5	Arbeidshypoteser vi ønsker å teste ut.....	20
5.1	Hypoteser.....	20
6	Resultater.....	22
7	Diskusjon.....	32
7.1	Bcl-2 .....	32
7.2	Caspase3 .....	32
7.3	Bcl-2 og caspase .....	33
7.4	Avslutning .....	33
8	Referanseliste .....	34

## Figurer

Figur 1: Pathogenesis of colorectal cancer: adenoma-carcinoma sequence .....	9
Figur 2: A genetic model for colorectal tumorigenesis .....	12
Figur 3: Utvikling av kolorektal kreft fra normalmucosa til metastatisk kreft. ....	13

## Tabeller

Tabell 1: TNM klassifikasjon, T-del .....	11
Tabell 2: TNM klassifikasjon, N-del.....	11
Tabell 3: TNM klassifikasjon, M-del .....	12
Tabell 4: Dukes stadier.....	12
Tabell 5: Genetic mutations that are associated with an increased risk of colorectal cancer ..	14
Tabell 6: Tabell over 54 pasient-karakteristika (totalt 54 pasienter). ....	22
Tabell 7.....	23

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

I postgenom-æraen er det erkjent at det er forandringer i proteinennivåene som har betydning klinisk, fordi det er proteinene som bestemmer hva cellen gjør. Proteinanalyser er derfor relevant forskning for å bedre carcinogeneseforståelse og prognosevurderingen.

Colorectal cancer er en modellsykdom for carcinogeneseutvikling, da alle stadier i kreftutviklingen er lett tilgjengelige for undersøkelse, og fordi tallmessig er dette den hyppigst forekommende kreftformen i i-land, begge kjønn samlet. Sykdommen behandles med kirurgi, med adjuvant kjemo- og strålebehandling til utvalgte undergrupper.

For seleksjon av pasienter til aggressiv tumorbehandling er det ønskelig med kunnskap om genetisk/epigenetisk forhold som henger sammen med dårlig prognose. Det er også viktig å undersøke om internasjonalt publiserte prognostiske markører har samme implikasjon i en norsk populasjon.

Den immunhistokjemiske og kombinerte kvalitative/kvantative vurderingen av materialet skal foregå på Patologiskanatomisk avdeling, Ahus, i samarbeid med overlege dr.med Solveig Norheim Andersen.

## 2 Kolorectal cancer

### 2.1 Epidemiologi

Det ble registrert 3453 nye tilfeller av kolonrectal cancer (1686 hos menn og 1767 hos kvinner) i 2006. Prevalensen var 24317 samme året (1). Kolorectalcancer rammer stort sett de eldste aldersgruppene, og bare 10 % forekommer under 55 år. Rectumcancer utgjør ca en tredjedel av alle kolonrectale svulster. Majoriteten av colonsvulstene sitter i området colon sigmoideum og colon ascendens inklusiv coecum, mens colon transversum, descendens og rectosigmoidovergangen har langt færre tilfeller (2)

### 2.2 Prognose

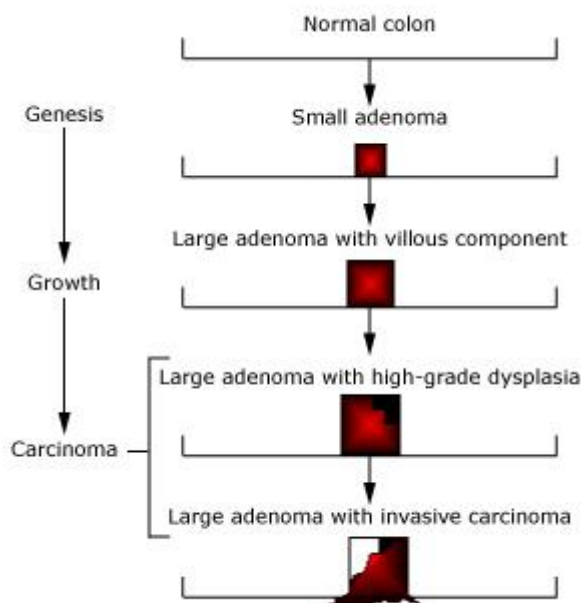
Ved lokalisert kolorectalcancer er 5-års relativ overlevelse 70-80%, ved regional spredning 50-60 %, mens ved fjernspredning på diagnosetidspunktet er kun 5 % i live etter 5 år.(2)

### 2.3 Risikofaktorer

Man antar at de fleste tilfeller av kolorectalcancer oppstår fra benigne forstadier i tarmen: polypper og adenomer. Det er kun adenomer som har et malignt potensial. Det er også funnet at kreftutvikling kan skje fra "flat" slimhinne. Etter adenom-karsinom-sekvens-teorien skjer det en initiering (en genetisk hendelse som begynner/igangsetter en neoplastisk transformasjon) av polyppen, deretter en vekstfase med økende grad av dysplasi, og til slutt en malign transformasjon. Denne utviklingen kan gjerne ta 5-15 år eller mer. Mens maligne foci forekommer i mindre enn 1 % av polyppene på under 1cm i diameter, finner man malignitet i 20-50 % av polyppene på over 2cm i diameter. Tendensen til malignitet er større ved multiple polypper, ved økende alder, og i høyre colon halvdel. Ut fra prevalens av adenomer og incidens av cancer, regner man med at bare 5-10 % av alle adenomer vil bli maligne om de får stå. Men da det ikke er mulig å si hvilke, må alle påviste polypper fjernes.

Adenomer forekommer sjeldent før fylte 50 år, men øker deretter med alderen. I høyinsidensland som Norge er prevalensen om lag 25 % i alder 50-60 år, og 50 % i alder over 70 år (2) (se figur 1).





**Figur 1: Pathogenesis of colorectal cancer: adenoma-carcinoma sequence**

Adapted from O'Brien, MJ, Winawer, SJ, Waye, JB. Colorectal polyps. In: Management of Gastrointestinal Diseases, Winawer, SJ (Ed). Gower Medical, New York, 1992. (3)

## 2.4 Kostfaktorer

Man mener at ulike kostbestandeler er hovedårsaken til den store forskjellen i forekomst av kolorektalcancer mellom u-land og i-land. Det er vist økt risiko for CRC ved høyt fettinntak. Noen studier har vist at risikoen er økt vesentlig ved mettet fett, fremfor umettet fett. Kjøtt, spesielt rødt kjøtt, har forekommet som en risikofaktor i noen, men langt fra alle studier. Høyt forbruk av alkohol og tobakk har også vist assosiasjon med økt polyppforekomst og til dels økt cancertendens, men resultatene er ikke entydige. Fedme, spesielt abdominal fedme, og fysisk inaktivitet er også angitt som risikofaktorer. Høyt fiberinntak i kosten i kosten har vært regnet som hoverårsak til den lave CRC-forekomsten i u-landene. Enkelte studier har vist en beskyttende effekt av grønnsaker og frukt. Antioksidantene, vitamin A, C, E og selen har i noen studier vist beskyttende effekt mot CRC (2).

## 2.5 Medikamenter

Flere studier har vist en redusert risiko for CRC hos pasienter som bruker acetylsalisylsyre (ASA) eller antiflogistika (NSAID'S). En randomisert kontrollert studie med ASA viste ingen effekt på risiko for CRC. Det er dog observert effekt på adenomdannelse (2).

## 2.6 Inflammatorisk tarmsykdom

Ulcerøs kolitt disponerer for CRC, avhengig av sykdommens varighet. Crohns sykdom er assosiert med en økt cancerinsidens, lokalisert til tidligere affisert området i colon. Risikoen er sannsynligvis halvparten av risikoen ved ulcerøs kolitt (2).

## 2.7 Arvelige syndromer

Noen personer har arvelig disposisjon for utvikling av kolorektale svulster. Hyppigst er såkalte HNPCC og FAP. Personer som tilhører en HNPCC-familie er som regel bærere av en

nedarvet mutasjon i "mismatch" reparasjonsgenene. LMSH2 eller LMSH 1. Ved FAP er tumorsuppressorgenet APC mutert i kimbanen (arvematerialet nedarvet fra en av foreldrene, genet er dominant, og finnes i alle celler i kroppen). Disse genene kan også være mutert i sporadiske cancere (2).

## 2.8 Arvelig colon-endometriekreft

(HNPCC) starter i ung voksen alder. Hos menn er første sykdomstegn utvikling av polypp/adenom og kolorektal cancer. Hos kvinner kan det ofte være endometriekreft. Også andre type kreft forekommer. Svulstene ved HNPCC er kjennetegnet av såkalt genomisk instabilitet (RER-fenomen). De klassiske kriterier for HNPCC er forekomst av nevnte kreftformer i tre generasjoner, en av disse er førstegrads slektning til de to andre og minst en er syk før 50 år. Denne form utgjør sannsynligvis 1-2 % av all kolorektalcancer. Personer med mistanke om HNPCC henvises regional medisinsk genetisk avdeling til utredning, genetisk veiledning og eventuelt gentesting (2).

## 2.9 Symptomer

Symptomene ved kolorektalcancer er oftest ukarakteriserte plager som blødning, smerter, endring i avføring og slapphet, men akutte problemer som ileus og perforasjon kan også føre pasienten til lege/sykehus. Generelt dominerer allmennsymptomer ved cancer i høyre side av colon, mens stenose og endringer i avføringsmønster er vanligere ved cancer i venstre colon. Blødning er et viktig symptom, fordi det hos en av åtte pasienter som klager over dette representerer et (potensielt) malignt kolorektalt problem.

Perforasjon av tumor er mer vanlig i høyre colonhalvdel enn i venstre, og er svært sjeldent et akutt problem ved rectumcancer. Massiv blødning forekommer hos 10-20%

Selv ved relativt stor primærtumor og ved spredning til for eksempel lever kan pasienten være helt uten symptomer. I slike situasjoner kan metastasen påvises før man finner primærtumor.

*Ved cancer i høyre colonhalvdel* er slapphet det vanligste symptom. Dette skyldes anemi som følge av okkult blødning fra tumor. Pasienten kan angi lokal smerte og ømhet. Tumor er palpabel i høyre side av abdomen hos ca 70 %. I vel 20 % gir tumor i høyre colonhalvdel obstruksjonssymptomer.

*Ved cancer i colon transversum og descendens* er endringer i avføringsmønster mer fremtredende. Ofte dreier det seg om tiltagende obstipasjon som kan veksle med diaré. I en del tilfeller er det også meteorisme og kolikksmerter. Cancer i venstre fleksur gir obstruksjon hos opptil 50 % av pasientene, mens dette generelt forekommer i venstre colonhalvdel hos 20 %. Tumor er palpabel i 10-15% av tilfellene.

*Ved cancer i sigmoideum og rectum* er blødning per rectum det hyppigste symptom. Blødning kan inntreffe sammen med slimavgang i forbindelse med avføring eller det kan være blødning isolert. Også her forekommer ofte endringer i avføringsmønster med obstipasjon og diaré. Ved rectumcancer kan pasienten ha hyppig avføringstrang og følelse av å ikke få tømt seg skikkelig. Selv avansert rectumcancer kan imidlertid gi svært sparsomme symptomer. Smerten kommer vanligvis sent i forløpet som følge av gjennomvekst og infiltrasjon i omliggende vev. Ved innvekst i blære eller prostata kan pasienten ha urinveissymptomer. Pneumaturi eller feces per vaginam tyder på gjennomvekst av tumor med sekundær fisteldannelse til blære eller vagina (2).

## 2.10 Diagnostikk

Sammen med sykehistorien er den kliniske undersøkelsen grunnleggende for videre diagnostikk hos pasienter med mistanke om kolorektalcancer. Rektal eksplorasjon og palpasjon av abdomen er standard. De kliniske funn kan i seg selv gi diagnosen, eller være veiledende for planen i den videre utredning.

Ved uklare abdominalsymptomer, anemi, eller slapphet bør det gjøres undersøkelse på blod i avføringen. En positiv prøve bør forledige undersøkelse av rectum og colon, fortrinnsvis rectoskopi/koloskopi. En negativ prøve på blod i avføringen utelukker ikke kolorektalcancer og videre utredning bør foretas avhengig av det kliniske bildet. Fekaltesten (undersøkelse på calprotectin i feces) har vært en del brukt i denne sammenheng, men spesifisiteten er for lav til at den kan anbefales for påvisning av cancer. Det bør tas blodprøver som inkluderer Hb, leverenzym, og kreatinin. CEA har ingen plass i påvisning av kolorektalcancer, men er obligatorisk preoperativt når kreftsykdommen først er diagnostisert.

Det skal ved påvist blod i avføringen eller annen klinisk mistanke om kolorektalcancer alltid gjøres rectoskopi. Sammen med eksplorasjon er dette den beste undersøkelsen av rectum. Rectoskopi utføres av noen allmennpraktikere, men vanligst er å henvise pasienten til kirurg/sykehuspoliklinikk. Ved positive funn tas samtidig biopsi. Koloskopi er i dag den beste måten å undersøke colon på med tanke på cancer i colon. Eventuelle funn kan samtidig verifiseres med biopsi eller behandles endoskopisk. Koloskopi er også viktig supplement når primær røntgenundersøkelse av colon har vist usikre forandringer (2).

### 2.10.1 Stadieinndeling

Stadieinndeling ved kolorektalcancer (TNM):

Tumorinfiltrasjon	
Tis	Karsinom in situ (grov dysplasi)
T1	Infiltrasjon i submucosa
T2	Infiltrasjon i muscularis propria
T3	Infiltrasjon i subserosa
T4	Infiltrasjon med perforasjon av viscerale peritoneum og/eller infiltrasjon i andre organer

Tabell 1: TNM klassifikasjon, T-del

Lymfeknutestatus	
N0	Lymfeknutemetastase ikke påvist
N1	Inntil 3 positive lymfeknuter
N2	4 eller flere positive lymfeknuter
N3	Positive apical lymfeknute

Tabell 2: TNM klassifikasjon, N-del

Fjernmetase	
M0	Ingen fjernmetastase
M1	Fjernmetastaser påvist

Tabell 3: TNM klassifikasjon, M-del

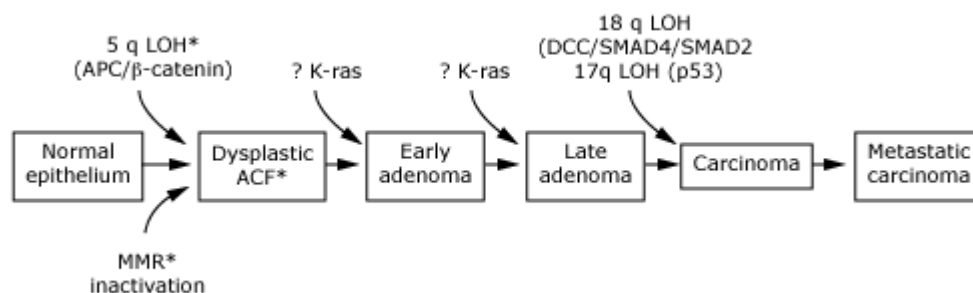
## 2.10.2 Dukes' stadieinndeling

Lymfeknutestatus	
Dukes' A	T1-T2, N0, M0
Dukes' B	T3-T4, N0, M0
Dukes' C	T1-T4, N1-N3, M0
Dukes' D	M1 eller gjenværende tumorvev

Tabell 4: Dukes stadier

## 2.11 Molekylær genetikk ved kolorektal kreft

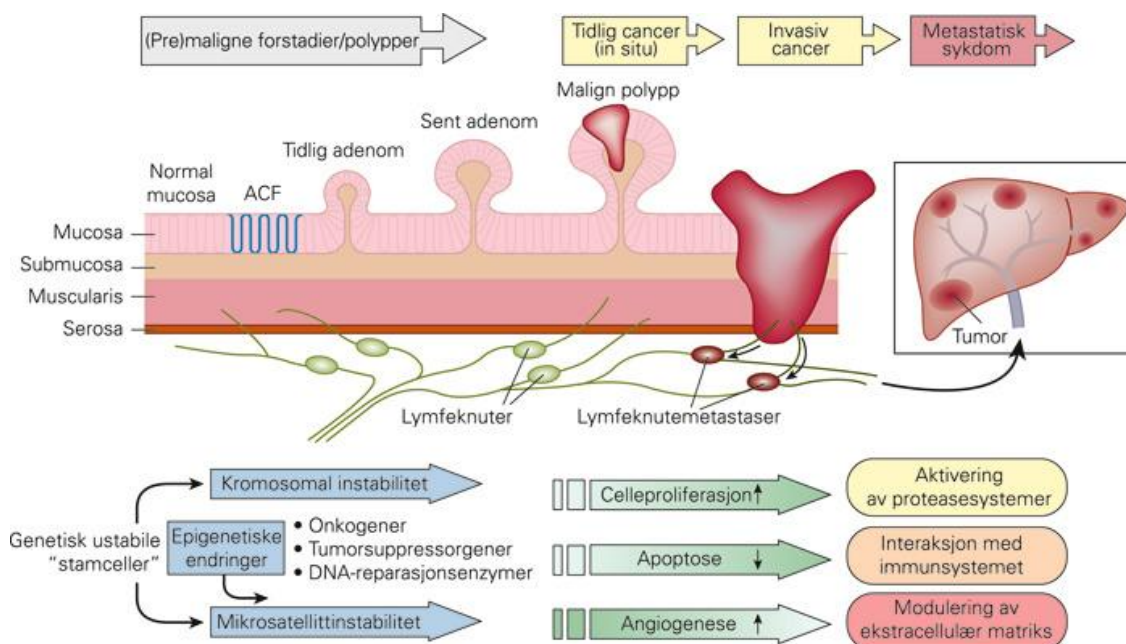
### 2.11.1 Modell 1



Figur 2: A genetic model for colorectal tumorigenesis

LOH: loss of heterozygosity; DCC: deleted in colon cancer gene; APC: adenomatous polyposis coli gene; ACF: aberrant crypt foci; MMR: DNA mismatch repair enzyme. Modified from: Lynch, JP, Hoops, TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16:775. (3)

### 2.11.2 Modell 2



Figur 3: Utvikling av kolorektal kreft fra normalmucosa til metastatisk kreft.

Utviklingen følger flere utviklingstrinn hvor multiple molekulære faktorer bidrar. Genetisk instabilitet er en tidlig drivkraft i karsinogenesisen. Interaksjon mellom multiple molekulære faktorer er avgjørende for vekst, invasjon og spredning. (ACF: aberrante kryptfokuser) (4)

### 2.11.3 Modell 3

Syndrome/disease	Responsible gene	Mode of acquisition
FAP	APC	Germline (inherited)
HNPCC (Lynch Syndrome)	MMR	
	hMSH2	
	hMLH1	
	hPMS1	
	hPMS2	
	hMSH3	
	hMSH6	
Sporadic Tumor	Tumor suppressor genes	Somatic (acquired)
	p53	
	DCC	

	APC	
	Oncogenes	
	myc	
	ras	
	src	
	erbB2	
	MMR genes (epigenetic change)	

**Tabell 5: Genetic mutations that are associated with an increased risk of colorectal cancer**

**FAP: familial adenomatous polyposis; APC: adenomatous polyposis coli gene; DCC: deleted in colorectal carcinoma gene; HNPCC: hereditary nonpolyposis colorectal cancer; MMR: mismatch repair gene. (3)**

### 3 Programmert Celledød; Apoptose

Antall celler i en multicellulær organisme er nøye regulert, ikke bare ved at det skjer celledeling men ved at antall celler som dør også reguleres. Dersom en celle ikke lenger er levedyktig begår den "selvmord" ved å aktivere en intracellulær celledødprogram. Denne prosessen kalles for programert celledød; apoptose.

Cellerdød som resultat av skade skjer ved at cellene svulmer opp og brister. Innholdet tømmes ut i vevet som resultat av celle nekrose, dette fører til vevskade pga en inflammatorisk respons.

Celler som begår apoptose dør uten å skape slik vevskade. Cellene skrumper inn og kondenserer. Cytoskjelett faller om, cellekjernen og DNA blir fragmentert. Overfalten på cellen forandres, dette medfører at cellen som begår selvmord blir raskt fagocyttert enten av nabocellen eller makrofager før noe lekkasje av cellekomponenter skjer (dermed forhindres vevskade slik som ved en inflammatorisk respons og celleinnholdet kan resirkulres) (5).

#### 3.1 P53

P53: Protein som har en nøkkelfunksjon i regulering av cellesyklus. Proteinet er en såkalt tumorsuppressor, det vil si at det hemmer ukontrollert celledeling og sørger for at celler med store skader blir drept (programmert celledød, apoptose).

Genet TP53 koder for et protein som er antatt å være det viktigste i kreftutviklingen i humane celler. Dette tumor suppressor genet er mutert i omtrent halvparten av alle kreftformer. P53 har en trippelfunksjon, det deltar i cellesyklus-kontroll, apoptose og opprettholder genetisk stabilitet.

Dersom det oppstår skade av DNA ved celledeling fører det til aktivering av p53. P53 er et genregulatorisk protein som stimulerer transkripsjon av andre gener (bl.a p21). Dette leder igjen til at cellen med skadet DNA ikke får dele seg inntil skaden er reparert. Er det umulig å rette på skaden undergår cellen programmert celledød (5).

#### 3.2 Bcl-2

Bcl-2 familien av intracellulære proteiner hjelper til å regulere aktivering av procaspaser. Noen av proteinene i denne familien, slik som Bcl-2 selv eller Bcl-XL, inhiberer apoptose, delvis ved å blokkere frigjøring av cytochrome c fra mitokondriene. Andre medlemmer av Bcl-2 familien inhiberer ikke apoptose men derimot promoterer procaspase aktivert celledød. En av apoptosepromotorene, Bad, har som funksjon å binde seg til og inaktivere proteiner i familien som inhiberer apoptose. Bax og Bak stimulerer frigjøring av cytochrome C fra mitokondriet. Dersom gener som koder for Bax og Bak er inaktivert er cellen utmerket resistens for nesten alle apoptose-induserende stimuli, dette indikerer disse proteinenes viktighet for apoptose induksjon. Bax and Bak aktiveres av andre apoptose-fremmende medlemmer av Bcl-familien slik som Bid (5).

Forandring i mengde av disse proteinene er assosiert med kreft. Slik som for mye ekspresjon av antiapoptotiske og redusert ekspresjon av pro-apoptotiske Bcl-2-familie gener (5).

#### 3.3 Caspaser

Det intracellulære maskineriet som er ansvarlig for apoptose ser ut til å være lik i alle multicellulære organismer. Denne avhenger av en familie proteaser (enzymmer) som har

Cystein på sitt aktive stede og som bryter binding på målprotein ved å spalte bindingen på det spesifikke Aspartat-syre. De kalles derfor caspaser. Caspaser syntetiseres i cellen som inaktive "forløpere", proteaser, som vanligvis aktiveres ved spaltning av Asparatsyre av andre caspaser. En aktivert caspase aktiverer flere procaspaser som igjen aktiverer andre caspaser, det skjer en proteolytisk kaskade (selvforsterkende effekt). Noen av de aktiverte caspasene spalter nøkkelproteiner i cellen. Andre spalter kjernelamina ved irreversibel nedbrytning av cellekjernen, enkelte caspaser aktiverer protein som holder DNA'ase (bryter ned DNA) i inaktiv form. På denne måten brytes cellen raskt ned og fagocyttert av andre celler. Proteolytiske kaskaden destruerer cellen, er selvampliserende og irreversibel (no point of return) (5).



## 4 Materiale og metode

### 4.1 Pasienter

Studiet er gjort på svulstvev fra 54 pasienter operert for colorectal cancer ved Akhurshus universitetssykehus i tiden mellom 1987 til 1989. Svulstvevet er formalinfiksert og inngikk i min veileder, Gunn Iren Meling, sitt doktorgradsmateriale. Vi samlet dette inn ved å gå gjennom arkivmateriale fra de 400 pasientene som var med i hennes studiet og identifiserte pasienter fra Ahus. Materialet er gjennomkarakterisert på kliniske og genteknologiske parametre, ikke minst er follow-up og overlevelse registrert på pasientene.

### 4.2 Immunhistokjemi

Farging av formalin fikserte parafin blokker med immunhistokjemisk metode hvor vi detekterer epitopene Bcl-2 og Cpp32, en retrospektiv analyse av 54 kreftsvulster klassifisert preklinisk og klinisk:

- 1) Snitter 4µm snitt på rotasjonsmikrotom av tidligere formalin fikserte parafin blokker.
- 2) Tørking av snittene i 60 °C over natten.
- 3) Deparafinering i ulike bad slik at snittene blir avparafinisert og rehydrert :
  - a. Xylenbad (2 × 5 min)
  - b. Absolutt alkohol (2 min)
  - c. 96 % alkohol (2 min)
  - d. 80 % alkohol (2 min)
  - e. Vann (2 min)
- 4) Epitop-gjenkjenning:
  - a. Forvarmer TRIS/EDTA buffer pH 9,1 i mikrobølgeovn til 101°C .
  - b. Setter avparafiniserte og rehydrerte snitt i forvarmet trisbuffer i mikrobølgeovn i 101 °C i 20 min.
- 5) Immunhistokjemi i Daco Autostainer (Immunhistokjemi slik som beskrevet i ulike artikler i litteraturen):
  - a. Trinn 1: Peroksydaseblokk
  - b. Trinn 2: Primærantistoff i fortynningsbuffer: Bcl-2 **1:100**, Cpp32 **1:750**.
  - c. Trinn 3: Sekundærantistoff: For Bcl-2 tilsettes monoklonal muse antistoff, for Cpp32 polyklonal kanin antistoff.
  - d. Trinn 4: Substrat buffer (DakoCytomation **EnVision+ System-HRP**): denne bufferen farger og gjør reaksjonene mellom antistoffet og antigenet synlig i vevet.
  - e. Trinn 5: Hematoxylen: rutine kjernefarging.
- 6) Dehydrering av snittene i ulike bad:
  - a. Vann (2 min)

- b. 80 % alkohol (2 min)
- c. 96 % alkohol (2 min)
- d. Absolutt alkohol (2 min)
- e. Sylenbad ( $2 \times 5$  min)

7) Snittene dekkes med monteringsmedium (dekkglass) og er klare til bruk.

Slik som beskrevet i flere artikler (5,6,7).

### 4.3 Antistoffer

Følgende antistoffer ble brukt i studiet:

#### 4.3.1 Cpp32

Polyclonal rabbit anti-human CPP32.

Cysteine protease protein 32 (CPP32), også kalt caspase-3, yama and apopain, er et medlem av interleukin -1 $\beta$ -converting enzyme familien av proteaser, som spesifikt spalter substrat på den c-terminale siden av aspartat syre. (produktkatalog dako). Positivt farging er cytoplasmatisk. Normale celler som plasmaceller farges også positivt og tjener som kontroll (7).

#### 4.3.2 Bcl-2

Monoclonal mouse Anti-human Bcl-2 Oncoprotein, klon 124, er beregnet til bruk i immunhistokjemi. Er et onkoprotein som gir blockade mot apoptotisk celledød. Positivt farging er i cytoplasma. Normale celler som blodlymfocytter farges også positivt og virker som kontroll i snittene (7).

#### 4.3.3 Statistikk

Det er satt opp "contingency" tabeller som viser våre funn sammenliknet med forventede verdier (0-hypotesen).

Konklusjon baseres på resultater utført ved Kji-kvadrat i programmet SPSS. En verdi hvor P er mindre enn 0,01 er tolket som signifikant.

Det er korrigert tilstrekkelig for multiple tester. Det er to grunner til dette:

Det første er at det ikke er noen klinisk utprøving og at studiet ikke har et testbatteri slik at hvis minst en av testene i batteriet er signifikante så er en ny behandling bedre enn gammel behandling. Vårt studie er mer eksplorativt (utforskende).

Det andre er at vi strekker metodene mot sitt "yttereste" fordi vi har så få observasjoner.

#### 4.3.4 Scoring av den immunhistokjemiske fargingen:

Det er scoret for både grad av ekspresjon og distribusjon ved å se på fargeintensiteten av Bcl-2 og caspase3 og anslå hvor mye av tumorvevet som er positivt i de mikroskopiske snittene. Fargeintensitet som er uttrykk for ekspresjonsgrad er blitt gradert fra 0-3, hvor 0 er ingen farge og 3 er sterk farget tumorvev. Distribusjonen er vurdert ved å anslå hvor mye av det totale tumorvevet som er positivt.

**4.3.5 Kvalitetskontroll i studiet vårt.**

Vi har kontrollsnitt i studiet vårt. Vi har både intern og ekstern kontroll. Intenkontroll i selveste snittene vi har sett på i mikroskop ved at normale lymfatiske celler farges positivt for Bcl-2, og normale plasmaceller farges positivt for caspase3. Den eksterne kontrollen ble gjort når det ble laget snitt med immunhistokjemisk metode ved at det ble inkludert ett positiv kontrollsnitt for hver runde i Dako Autostainer.

## 5 Arbeidshypoteser vi ønsker å teste ut

### 5.1 Hypoteser

Alle hypoteser er basert på abstrakter identifisert gjennom en ikke-systematisk søk i Pubmed. Hypotesene er ikke omformulert til de respektive null-hypotesene.

#### 5.1.1 Bcl-2

Det hersker stor uenighet når det gjelder den prognostiske betydningen av at tumorvev uttrykker Bcl-2.

Flere har vist økt overlevelse hos pasienter med colorektalcancer der tumorvevet uttrykker proteinet (8,13,14). Dersom man satte inn variabler slik som alder, kjønn, tumorlokalisasjon eller Dukes stadiet inn i en multivariat analyse var den bedrede overlevelsen uavhengig av tumorstadiet (13).

I midlertidig fant andre at Bcl-2 proteinekspresjon ikke hadde betydning prognostisk, og heller ikke var korrelert med patologisk sykdomsgrad TNM eller Dukes' stadium) (9,12).

Andre igjen har funnet at Bcl-2 positive svulster er sterke indikatorer for dårlig prognose (10).

#### 1) Prognosehypoteser

- a. **Har pasienter med colorektalcancer hvor tumorvevet uttrykker Bcl-2 proteinet bedre eller dårligere prognose enn pasienter med lite eller ingen Bcl-2?**
- b. **Denne sammenhengen er uavhengig av Dukes'stadiet.**
- c. **Det er en sammengeng mellom Bcl-2 uttrykkelse og Dukes' stadiet.**

#### 2) **Det er assosiasjon mellom Bcl-2 proteinekspresjon og klinisk-patologiske variabel slik som differensieringsgrad.**

Noen forskere har funnet at det er en større grad av Bcl-2 og P53 uttrykt i tykktarmsadenomer sammenliknet med carcinomer, og uttrykkelsen hadde korrelasjon med grad av dysplasi (10).

#### 3) **Er graden av Bcl-2 uttrykt korrelert med grad av cellulær atypi?**

Flere studier viste ingen sammenheng mellom P53 ekspresjon og Bcl-2 (18,19).

Noen fant at en gruppe med kombinasjon av Bcl-2(+) og P53(-) svulster hadde bedre prognose og denne gruppen hadde oftest tidlig Dukes' stadiet.(11) Det er videre vist at dersom Bcl-2 koeksisterer med positivt P53, er kombinert proteinekspresjon bedre for prognosen (19).

#### 4) **BCL- og P53 hypoteser:**

- a. **Er det assosiasjon mellom Bcl-2 og P53?**
- b. **Er koeksistens av Bcl-2- og P53 proteinekspresjon forbundet med bedre prognose?**

Det er tidligere funnet signifikant økt antall Bcl-2-positive rectumtumores hos kvinner sammenliknet med menn (12). Det er ikke vist signifikant assosiasjon mellom Bcl-2 og pasientens alder, tumor lokalisasjon (9,12), eller kjønn (13).

- 5) Det er en assosiasjon mellom Bcl-2 ekspresjon og kjønn, alder og lokalisasjon.**

### **5.1.2 Hypoteser vedrørende Caspase**

Enkelte studier har vist en sammenheng mellom høyt aktivitetsnivå av caspase-3 målt med biokjemisk assay i kolorectale svulster og økt risiko for lokal residiv av kreften (15,16).

Andre har ikke klart vise en signifikant sammenheng mellom grad av apoptose ved å måle caspase3 aktivitet og Dukes' stadiet og histologisk grad av tumorvev som ble undersøkt, dvs prognosen (16,17).

- 6) Caspase-3 og klinisk-patologiske variabler:**

- a. Er høy aktivitet av enzymet caspase-3 i kolorectale svulster er forbundet økt risiko for kreftresidiv?**
- b. Har pasienter med med lavt nivå av caspaseaktivitet i tumorvevet bedre eller dårligere overlevelse/prognose?**
- c. Denne sammenhengen er uavhengig av Dukes'stadiet og differensieringsgrad.**

Noen funn tyder på at høyt nivå av caspase-3 finnes oftere i svulster lokalisert på høyre side (15). I midlertidig viser andre at det er ingen sammenheng mellom høy caspaseaktivitet og tumorlokalisasjon (16,17).

- 7) Høy caspase-3 aktivitet finnes oftere i svulster lokalisert til høyre side av kolon?**

Videre har det ikke blitt funnet noen sammenheng mellom grad av apoptose ved å måle caspaseaktivitet i tumorvev i colonrectum og pasientens alder (16,17).

- 8) Høy grad av apoptose i tumorvev målt med caspaseaktivitet har ingen sammenheng med pasientens alder.**

Det er ikke funnet noe signifikant sammenheng mellom høy caspase-3 aktivitet og forandring av proteineksprejon av P53, eller mismatch reparasjonsgener.(15)

Det er høyere aktivitet av caspase-3 liknede enzymet i normal mucosa og tumorvev hos kvinner sammenliknet med menn (17).

- 9) Det er høyere forekomst av caspaseaktivitet i vev fra kvinner sammenliknet med menn.**

## 6 Resultater

Tumorvev fra 54 pasienter farget med immunhistokjemi for å detektere Bcl-2 og Caspase3. Kliniske detaljer som kjønn, differensieringsgrad, lokalisasjon, Dukes' stadiet og residiv er vist i Tabell 6 og Tabell 7.

**Tabell 6: Tabell over 54 pasient-karakteristika (totalt 54 pasienter).**

Karakteristikk		Antall	Alder (median)
BCL-2	Lite	37	65,2 (24 - 87 )
	Middels	11	63,8 (26 - 80 )
	Mye	6	60,7 (34 - 80 )
Cpp32	Lite	15	62,6 (24 - 80)
	Middels	19	66,7 (34 - 82)
	Mye	19	64,3 (26 - 87)
	Ikke avlesbar	1	
Tilbakefall	Prim	2*	
	No	37	
	Yes	15	
Kjønn	Menn	29	
	Kvinner	25	
Lokalisasjon	Høyre	9	
	Venstre	18	
	Rectum	27	
Duke's stadium	A	8	
	B	26	
	C	13	
	D	7	
Differensieringsgrad (WHO)	Lite	4	
	Middels	48	
	Høyt	2	

TP53 mutert	Yes	15
	B Yes	2
	No	12
	Ikke gjort	24
P53 proteinet	0	5
	< 5% pos	8
	5 – 50%	8
	> 50%	1
	Ikke gjort	32
C-diff	Lite	12
	Middels	38
	Høyt	4

\*: Sensurert ut av studiet p.g.a. ny primærsvulst

**Tabell 7**

c-nr	kjønn	BCL2	BCL2 areal%	CPP32	CPP32 areal%	Lokalisasjon	Diff	Dukes	Residiv	TP53 mut.	p53-prot
1,185	m	1	30	3	90	ve. flexur	midd	B	pri	no	0
1,330	m	0		2	30	sigmoideum	midd	B	no		
1,062	m	0		3	90	rectum	midd	B	yes	no	< 5% pos
937	f	0		2	80	h>. flexur	midd	B	no		
1,038	m	0		3	50	rectum	midd	C	yes	yes	5-50% pos
1,340	m	0		2	80	rectum	midd	D	no	yes	5-50% pos
932	m	0		3	80	rectum	midd	B	no	yes	< 5% pos
1,389	f	0		3	80	coecum	midd	B	yes	yes	5-50% pos
1,071	f	1	30	2	80	sigmoideum	h>yt	A	no	yes	5-50% pos
1,023	m	0		1	80	rectum	midd	B	yes		

1,382	f	1	5	3	50	rectum	midd	B	pri	yes	< 5% pos
1,284	m	0		2	50	rectum	midd	B	no	yes	
1,343	f	0		3	50	rectum	midd	B	no		
1,125	m	1	5	2	50	rectum	midd	D	no	yes	
909	m	0		2	80	rectum	midd	C	yes		
1,332	f	1	5	3	50	coecum	midd	C	no		
1,028	f	0		2	80	acendens	h>yt	B	no		
983	m	0		2	80	sigmoideum	midd	B	no		
1,388	f	1	10	3	90	ve. flexur	lite	D	no		
1,361	m	1	5	1	30	rectum	midd	A	no		
1,064	f	0		1	80	rectum	midd	D	no		
1,323	f	0		3	80	rectum	midd	B	yes	no	0
1,026	m	0		1	30	rectum	midd	A	yes	yes	5-50% pos
938	f	0		1	80	ve. flexur	lite	C	yes		
1,259	m	0		2	80	acendens	midd	B	no		
1,273	f	0		2	50	h>. flexur	midd	B	no	no	
1,368	m	2	30	3	80	sigmoideum	midd	D	no	yes	> 50% pos
1,068	m	0		2	50	rectum	midd	B	yes	no	< 5% pos
1,286	f	0		2	80	coecum	midd	B	no	yes	5-50% pos
1,407	f	1	5	3	90	rectum	midd	A	no	no	0
911	m	2	30	ikke tolkbar		coecum	midd	D	no		
1,152	m	0		3	80	rectum	midd	B	no	no	
1,402	m	0		2	50	coecum	midd	C	yes	yes	0
1,175	f	0		1	80	sigmoideum	midd	B	no		
914	f	0		3	80	rectum	midd	B	no	no	< 5% pos
941	m	0		1	30	sigmoideum	midd	B	no	yes	< 5% pos
962	m	0		1	10	sigmoideum	midd	C	no	no	< 5% pos
904	m	0		2	30	sigmoideum	midd	B	no	yes	< 5%



											pos
1,079	f	2	30	1	80	sigmoideum	midd	C	yes		
1,111	f	2	50	3	80	sigmoideum	midd	A	no	no	
1,333	f	0		1	50	rectum	lite	C	yes		
1,133	m	2	50	2	50	rectum	midd	B	no		
1,393	f	0		1	50	rectum	midd	C	yes		
1,157	m	0		0		rectum	lite	C	no		
1,049	m	0		3	80	desendens	midd	C	yes	yes	5-50% pos
990	f	1	5	1	80	rectum	midd	D	no		
1,355	f	1	10	1	50	rectum	midd	B	no		
1,138	f	1	10	2	80	rectum	midd	B	no	yes	0
1,275	m	0		2	90	sigmoideum	midd	C	yes		
1,112	f	0		3	90	rectum	midd	B	no	no	
1,248	m	0		2	90	sigmoideum	midd	A	no		
942	m	0		1	50	sigmoideum	midd	A	no		
1,085	f	0		3	80	rectum	midd	C	no	yes	5-50% pos
1,099	m	2	50	3	80	sigmoideum	midd	A	no	no	

Av de 54 snittene med colorectal svulstvev vi scoret for Bcl-2 ved å se i mikroskop, viste totalt 17 stykker uttrykkelse, av disse var 11 stykker farget svak positivt (svak intensitet på fargen i snittet) og 6 stykker var sterkt positive. Av disse 11 svulstene med svakt Bcl-2 uttrykkelse, hadde 6 stykker Bcl-2 positivt svulstvev under 5 %, 3 stykker hadde 5-30 % positivt Bcl-2 svulstvev, og 2 stykker hadde 31-50% Bcl-2 positivt svulstvev, vurdert semi-kvantitativt ved hjelp av visuell evaluering i mikroskop av forfatteren av denne oppgaven. De 6 med sterkt fargeintensitet hadde halvparten 31-50 % Bcl-2 positivt svulstvev og den andre halvparten hadde over 50 % Bcl-2 positivt svulstvev.

For caspase3 var 15 av snittene med svulstvev svakt positivt farget for dette antistoffet, 19 stykker var farget middels, og de resterende 19 viste sterkt fargeintensitet. Når det gjelder hvor mye av svulstvevet som var caspase3 positivt, økte denne med økende fargeintensitet.

### 6.1.1 Bcl-2

Tilbakefall:

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Prim	0	2	0	2	1,4	0,4	0,2	2
Yes	14	0	1	15	10,3	3	1,7	15
No	23	9	5	37	25,3	7,5	4,1	37
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,063

Prim betyr at pasienten fikk ny primærsvulst, og ble derfor sensurert ut av studien. Av de tilbakefallene som er, dvs 15 stykker, er nesten alle i de med lite Bcl-2.

Kjønn:

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Mann	22	3	4	29	19,9	5,9	3,2	29
Kvinne	15	8	2	25	17,1	5,1	2,8	25
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,15

Lokalisasjon:

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Høyre	7	1	1	9	6,2	1,8	1	9
Venstre	11	3	4	18	12,3	3,7	2	18
Rectum	19	7	1	27	18,5	5,5	3	27
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,34

Dukes:

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
A	3	3	2	8	5,5	1,6	0,9	8
B	21	4	1	26	17,8	5,3	2,9	26
C	11	1	1	13	9	2,7	1,4	13
D	2	3	2	7	4,8	1,4	0,8	7
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,048

Det er en tendens til at Dukes' B og C svulster har svakere Bcl-2 farving enn forventet.

**Differensiering:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Lite	3	1	0	4	2,7	0,8	0,4	4
Middels	33	9	6	48	32,9	9,8	5,3	48
Mye	1	1	0	2	1,4	0,4	0,2	2
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,77

**C-diff:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Lite	9	2	2	12	8,9	2,6	1,4	12
Middels	26	8	3	37	25,4	7,5	4,1	37
Mye	2	1	1	4	2,7	0,8	0,4	4
Totalt	37	11	6	54	37	11	6	54

Chi-Square: 0,80

**TP53 mutert:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Yes	12	4	1	17	1,7	3,5	1,8	17
No	8	2	2	12	8,3	2,5	1,2	12
Totalt	20	6	3	29	20	6	3	29

Chi-Square:

**P53 protein:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
0	2	3	0	5	3,6	1,1	0,2	5
< 5%	7	1	0	8	5,8	1,8	0,4	8
5 - 50%	7	1	0	8	5,8	1,8	0,4	8
> 50%	0	0	1	1	0,7	0,2	0,0	1
Totalt	16	5	1	22	16	5	1	22

Chi-Square: 0,00

Det er for få celler som har mer enn 5 som det forventede antall, derfor kan resultatet ikke tolkes som signifikant.

**Areal BCL-2:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
< 5%		6	0	6		3,9	2,1	6
5-30%		3	0	3		1,9	1,1	3
31-50%		2	3	5		3,2	1,8	5
> 50%		0	3	3		1,9	1,1	3
<b>Totalt</b>		11	6	17		11	6	17

**Chi-Square: 0,08**

Med økende Bcl-2 uttrykkelse øker også prosentvis areal som er positivt farget.

**Cpp32:**

	BCL-2				Forventet BCL-2			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
<b>1</b>	11	3	1	15	10,5	3,1	1,4	15
<b>2</b>	15	3	1	19	13,2	4	1,8	19
<b>3</b>	11	5	3	19	13,2	4	1,8	19
<b>Totalt</b>	37	11	5	53	37	11	5	53

**Chi-Square: 0,66**

Ingen signifikant sammenheng mellom Bcl-2 og caspase3.

### 6.1.2 Caspase

Tilbakefall:

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Prim	0	0	2	2	0,6	0,7	0,7	2
Yes	6	4	5	15	4,2	5,4	5,4	15
No	9	15	12	36	10,2	12,9	12,9	36
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

Chi-Square: 0,51

Prim betyr at pasienten fikk ny primærsvulst, og ble derfor sensurert ut av studien.

Kjønn:

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Mann	7	13	8	28	8	10	10	28
Kvinne	8	6	11	25	7	9	9	25
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

Chi-Square: 0,24

Lokalisasjon:

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Høyre	0	6	2	8	2,3	2,9	2,9	8
Venstre	6	6	6	18	5	6,5	6,5	18
Rectum	9	7	11	27	7,6	9,7	9,7	27
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

Chi-Square: 0,12

Dukes:

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
A	3	2	3	8	2,3	2,9	2,9	8
B	4	12	10	26	7,4	9,3	9,3	26
C	6	3	4	13	3,7	4,6	4,6	13
D	2	2	2	6	1,7	2,2	2,2	6
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

Chi-Square: 0,53

**Differensiering:**

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Lite	3	0	1	4	1,1	1,4	1,4	4
Middels	12	17	18	47	13,3	16,9	16,9	47
Mye	0	2	0	2	0,6	0,7	0,7	2
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

**Chi-Square: 0,08**

Ser en tendens til at de fleste caspase3 positive svulster er middels differensierte.

**C-diff:**

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Lite	5	6	2	12	3,4	4,3	4,3	12
Middels	9	13	15	37	10,5	13,3	13,3	37
Mye	1	0	2	3	0,8	1,1	1,1	3
Totalt	15	19	19	53	15	19	19	53

**Chi-Square: 0,32****TP53 mutert:**

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
Yes	2	8	7	17	1,8	5,8	9,4	17
No	1	2	9	12	1,2	4,3	6,6	12
Totalt	3	10	16	29	3	10	16	29

**Chi-Square: 0,18****P53 protein:**

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
0	0	2	4	6	0,8	1,8	3,5	6
< 5%	2	2	4	8	1	2,4	4,5	8
5 - 50%	1	3	4	8	1	2,4	4,5	8
> 50%	0	0	1	1	0,1	0,3	0,6	1
Totalt	3	7	13	23	3	7	13	23

**Chi-Square: 0,85**

**Areal Cpp32:**

	CPP32				Forventet CPP32			
	Lite/0	Middels	Mye	Total	Lite/0	Middels	Mye	Totalt
<b>0-30%</b>	5	2	0	7	2	2,5	2,5	7
<b>31-80%</b>	10	15	14	39	11	14	14	39
<b>&gt; 81%</b>	0	2	5	7	2	2,5	2,5	7
<b>Totalt</b>	15	19	19	53	15	19	19	53

**Chi-Square: 0,084**

Med økende caspase3 aktivitet øker også prosentvis areal som er positivt farget.

## 7 Diskusjon

### 7.1 Bcl-2

Det er i de siste årene blitt en økende interesse for forandringer på proteinnivå for å få en bedre forståelse for carcinogenese utviklingen, og kreftproteiners betydning for det kliniske forløpet og prognosen hos pasienter med colorektalkreft.

Mange studier har evaluert betydningen av Bcl-2 proteinets ekspresjonsprofil i colorectale svulster, men resultatene er motstridende.

Vårt formål har vært å analysere ekspresjonsprofilen til Bcl-2 i pasientmateriale fra Ahus, og se på sammenhengen mellom Bcl-2 og caspase3 uttrykt i tumorvev sammenholdt med kliniske variabler og prognose.

Det er en tidligere hypotese om at økt uttrykt Bcl-2 predisponerer til utvikling av colorectal kreft ettersom proteinet fører til redusert apoptose og derav økt celleoverlevelse når det utsettes for carcinogenetiske agens (20). Men studier har demonstrert ulike resultater (9,10,12).

Våre resultater viser tendens til en bedre overlevelse hos pasienter hvor tumorvevet uttrykker Bcl-2 ettersom de sjeldnere for tilbakefall av sin kreftform (Kji-kvadrat test,  $p=0,063$ ). Videre fant vi at de fleste pasienter med Bcl-2 positive svulster har Dukes' stadium B eller C (Kji-kvadrat test,  $p=0,048$ ). Det er i enkelte studier vist samme tendens (), mens andre igjen ikke har klart å vise noe sammenheng mellom Bcl-2 og tumor stadium (13).

Vi har ikke funnet sammenheng mellom pasientens kjønn, lokalisasjon av tumor i colonrectum og differensieringsgrad, og ekspresjon av Bcl-2 i materialet vårt, slik enkelte studier tidligere har vist (9,12,13).

Videre har vi heller ikke klart å vise noen sammenheng mellom Bcl-2 og mutasjon på proteinet P53 slik som noen artikler tidligere har påvist (18,19,11).

Noen har vist at Bcl-2 er assosiert med avansert histologisk grad og aggressivt tumorvev (10), mens andre har vist et mer favorabelt klinisk utfall i samsvar med våre resultater (mindre tilbakefall) (14).

Inntil noen lovende studier kan vise noen klar sammenheng mellom Bcl-2 ekspresjon i colorectale svulster og prognostiske faktorer vil betydningen av Bcl-2 uttrykkelse være uklar.

### 7.2 Caspase3

I studiet vårt har vi målt grad av apoptose ved også å måle/score caspase3 ekspresjon ved immunhisokjemi.

Apoptose er en essensiell biologisk prosess. Defekter i denne biologiske prosessen finnes ofte ved neoplastisk utvikling, slik at en genetisk forandret celle klarer å overleve, som normalt ville gjennomgå programmert celledød.

Formålet vårt var, som ved å analysere Bcl-2 uttrykkelse, å se på caspase3 som en markør på apoptose i tumorvev, og vurdere om grad av apoptose kunne vise noe sammenheng med kliniske parametere som prognose, residiv, lokalisasjon, kovariasjon med P53 mutasjon, alder



og kjønn. Våre resulater viste en tendens til at de fleste caspase positive svulster var middel differensierte (Kji-kvadrat test,  $p=0,07$ ), men resultatet må tolkes uhyre forsiktig da flere en 6 celler fremsatt i en to-veis tabell hadde mindre 5 i antall.

Vi klarte ikke å demonstrere noen sammenheng mellom apoptosegrad målt med økt caspase3 ekspresjon i svulstevev fra colonrectum og økt eller redusert tilbakefall av kreften. Det er i flere studier vist at økende grad av apoptose ved å måle caspase3 aktivitet i colonrectale svulster, gir større risiko for residiv og er dermed assosiert med dårligere prognose (15,16). Vi klarte ikke å vise en slik sammenheng.

Høy apoptosegrad har i noen studier vært relatert til forandringer i P53 funksjonen. Våre funn kunne ikke bekrefte det.

Flere studier har vist at det er ingen sammenheng mellom apoptosegrad og pasientens alder og kjønn (15). Dette funnet kan bekreftes i våre resultater.

### 7.3 Bcl-2 og caspase

Pasientmaterialet i studiet vårt har vist at det er en sammenheng mellom grad av Bcl-2- og caspase3 ekspresjon og distribusjon. Det vil si at med økende fargeintensitet (ekspresjon) av Bcl-2 og Caspase3 i tumorvevet, øker også størrelsen på arealet som er "positivt" (Kji-kvadrat test,  $p=0,008$  og  $p=0,084$ ). Det er ikke funnet noen studier ved søk i pubmed som har beskrevet noen sammenheng mellom fargeintensitet og fargeutbredelse, med forbehold om at kun artikkelens abstrakt er lest.

Resultater fra studiet vårt har vist ingen sammenheng mellom uttrykkelse av Bcl-2 positive svulster og Caspase3 positive svulster, altså er de uavhengig av hverandre og fanger muligens opp to ulike ting. En slik sammenheng er tidligere beskrevet (999), men studiet vårt kunne ikke bekrefte det samme.

### 7.4 Avslutning

Inntil større, muligens metaanalyse-studier kan vise noen klar sammenheng mellom Bcl-2 ekspresjon i colorectale svulster og prognostiske faktorer vil betydningen av Bcl-2 uttrykkelse i en prognostisk og terapeutisk sammenheng være uklar. Det samme gjelder for apoptosegrad i tumorvev ved å måle caspase3 aktivitet.

Noe av forklaringen på så motstridene resultater i litteraturen, kan være at Bcl-2 proteinet og enzymet caspase3 har ulik og avansert interaksjon med andre onkogener og tumor suppressor gener. Det kan og tenkes at i noen svulster kan Bcl-2 og caspase3 være en biologisk fenomen uten å ha særlig betydning for carcinogene stien ("pathway").

Videre bør det inkluderes flere pasienter i studiet vårt, foruten det kan en eventuell signifikans kun tolkes med stor forsiktighet ettersom Pearson kji-kvadrat test krever at ikke flere enn 3 celler skal/bør ha  $n < 5$  når det settes opp "contingency table" eller "toveis tabell". Altså at  $n$  må være høyere enn 5 i de aller fleste celler. Det kan føre til Type2 feil, altså at man ikke forkaster  $H_0$ -hypotesen når den er usann, fordi man ikke har nok observasjoner. Dette er en svakhet i studiet vårt.

## 8 Referanseliste

- (1) [www.kreftregisteret.no](http://www.kreftregisteret.no); Cancer in Norway 2006
- (2) Kåresen R og Wist E (eds); **Kreftsykdommer, en basisbok for helsepersonell**. ISBN 9788205334946. 2 utgave. Gyldendal akademiske forlag; 2005
- (3) [www.up2date.com](http://www.up2date.com). Sist oppdatert februar 2008-04-23
- (4) Søreide K: **Genetikk og molekylær klassifisering ved kolrektal kreft**. Tidsskrf Nor Lægeforen 2007; 127:2818-23.
- (5) Albert, Bruce; Johanson, Alexander, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, Walter, Peter (eds); **Molecular Biology of the Cell**.
- (6) Bioingeniøren Randi ved Ahus, og Patolog Solveig Andersen Norheim ved Ahus
- (7) Produktkatalog fra Dako.
- (8) Zavidares H, Zizi-Sermpetzoglou A, Elemenoglou I, Papatheofanis I, Persos G, Athanasas G et al: **Immunohistochemical expression of bcl-2 in Dukes' stage B and C colorectal carcinoma patients: correlation with p53 and ki-67 in evaluating prognostic significance**. Pol J Pathol. 2005;56(4):179-85.
- (9) Pereira H, Silva S, Juliao R, Garcia P, Perpetua F: **Prognostic markers for colorectal cancer: expression of P53 and BCL2**. World J Surg. 1997 Feb;21(2):210-3.
- (10) Tzouvala M, Lazaris AC, Papatheodoridis GV, Kouvidou C, Papathomas TG, Kavantzaz N et al: **Potential role of apoptosis and apoptotic regulatory proteins in colorectal neoplasia: correlations with clinico-pathological parameters and survival**. Dig Dis Sci. 2007 Jun 12.
- (11) Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ: **Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma**. J Zheijiang Univ Sci B. 2005 Dec;6(12):1163-9.
- (12) Conte PC, Contu SS, Monreiria LF: **Bcl-2 expression in rectal cancer**. Arg Gastroenterol. 2006 Oct-Dec;43(4):284-7.
- (13) Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey Na: **bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer**. Histopathology. 1999 Oct;35(4):360-7.
- (14) Biden KG, Simms LA, Cummings M, Buttenshaw R, Schoch E, Searle J et al: **Expression of Bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability**. Oncogene. 1999 Feb 4;18(5):1245-9.

- (15) Jonges Le, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde EA, Tollenaar RA, Flueurem GJ et al: ***Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma***. Lab Invest. 2001 May;81(5):681-8.
- (16) de Heer P, de Bruin EC, Klein-Kranenbarg E, Aalbers RI, Marijnen CA, Putter H et al: ***Caspase-3 activity predicts local recurrence in rectal cancer***. Clin Cancer Res. 2007 Oct 1;13(19):5810-5
- (17) Leonardos L, Butler LM, Hewett PJ, Zalewski PD, Cowled PA: ***The activity of caspase-3-like proteases is elevated during the development of colorectal carcinoma***. Cancer Lett. 1999 Aug 23;143(1):29-35.
- (18) Gaitromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC et al: ***Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma***. Cancer. 1999 Oct 15;86(8):1421-30.
- (19) Zavrides H, Zizi-Sermpetzoglou A, Elemenoglou I, Papatheofanis I, Persos G, Athanasas G et al: ***Immunohistochemical expression of bcl-2 in UICC stage I and III colorectal carcinoma patients: correlation with c-erbB-2, p53, ki-67, CD44, laminin and collagen IV in evaluating prognostic significance***. Pol J Pathol. 2006;57(3):149-59.
- (20) Que FG, Gores GJ: Cell death by apoptosis: ***basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist***. Gastroenterology. 1996 Apr;110(4):1238-4.